

阿波晩茶由来乳酸菌が産生する菌体外多糖に関する研究

1. 目的

県内企業の乳酸菌を利用した製品開発を支援するため、先行研究で阿波晩茶から有用な乳酸菌を分離してきた。これまでに分離された乳酸菌の中に、菌体外多糖（以下、EPS）を産生する菌株が得られた。EPS産生乳酸菌は免疫活性等の生理活性が報告されているが、阿波晩茶由来乳酸菌については明らかになっていない。

本研究では、EPSを産生する阿波晩茶由来乳酸菌について、発光培養細胞によるレポーターアッセイ法で免疫関連因子 Nuclear factor- κ B（以下、NF- κ B）の活性を測定し、免疫活性を評価した。

2. 方法

2-1. 試料の調製

EPS産生乳酸菌として、細胞膜外膜に結合した荚膜EPSを産生する *Lactiplantibacillus pentosus* AWA1922 と、菌体から遊離したスライムEPSを産生する *L. pentosus* AWA1955 を使用した。また、比較のためEPSを産生しないと考えられる *L. pentosus* AWA1915 と *L. pentosus* NBRC106467 を使用した。

菌体は以下のように調製した。乳酸菌をMRS液体培地で培養した後、遠心分離により集菌し、菌体を超純水で2回洗浄した。菌体を凍結乾燥した後、超純水で懸濁し、80℃で30分間加熱処理を行った。

EPSは以下のように調製した。MRS液体培地で乳酸菌を培養し、上清についてトリクロロ酢酸による除タンパク、Deoxyribonuclease 1（富士フィルム和光純薬）と Ribonuclease A（ニッポンジーン）による核酸分解、Proteinase K（富士フィルム和光純薬）によるタンパク分解を行った。トリクロロ酢酸で再び除タンパク処理を行った後、エタノールを加えて生じた沈殿を排除分子量6-8 kDで透析し、凍結乾燥した。

2-2. 発光培養細胞による免疫活性の評価

細胞にはNF- κ Bの活性化に伴い発光するマウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞を使用した。試料を発光培地（DMEM phenol red free, 10%FBS, 1× Glutamax, 25 mM HEPES, 400 μ M ルシフェリン）を用いて希釈した。試料濃度は、菌体は100 μ g/mL, EPSは10, 100, 1,000 μ g/mLとした。24ウェルプレートに細胞を5×10⁵ cells/wellで播種し、37℃, 5%CO₂下で24時間培養した。培養後、培地を除き、試料を含む発光培地を加えて培養細胞リアルタイム発光測定装置 WSL-1565 Kronos HT（アトー）を用いて10時間リアルタイム発光測定を行った。得られた発光

キネティクスの面積を溶媒対照の面積で補正した。測定後の細胞について、細胞毒性アッセイキット Cell Counting Kit-8（同仁化学研究所）を用いて細胞毒性の評価を行った。

3. 結果および考察

試料に菌体を用いた結果は、EPS産生株であるAWA1922とAWA1955が他の菌株よりもNF- κ Bを活性化した（図1A）。活性本体にEPSの関与を予想し、EPSの精製を試みたが、AWA1922の荚膜EPSは精製できず、AWA1955のスライムEPSのみ精製できた。AWA1955のEPSについてNF- κ B活性を評価したところ、EPSの濃度依存的にNF- κ Bは活性化された（図1B）。また、全ての試料において細胞毒性は検出されなかった（データ不掲載）。これらの結果から、EPS産生株のAWA1922とAWA1955は免疫活性作用を示し、活性本体にはEPSが関与していることが示唆された。

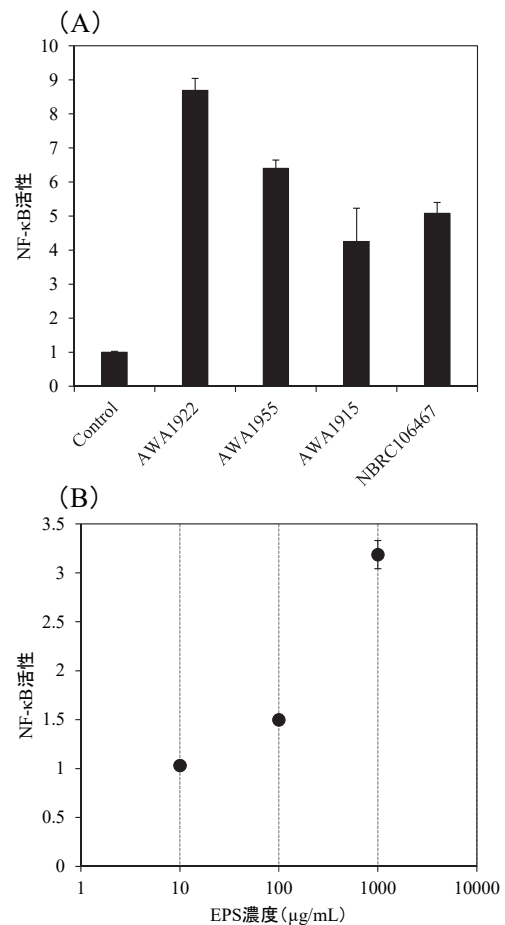


図1. 阿波晩茶由来乳酸菌のNF- κ B活性評価
(A) 菌体, (B) EPS